

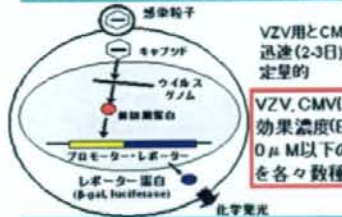
Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果) の概要図等

サイトメガロウイルス(CMV)及び水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の感染初期過程を阻害する抗ウイルス薬の検索

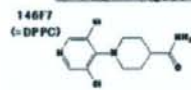
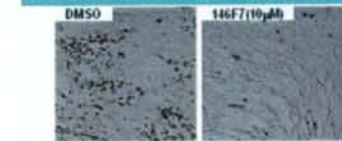
目的 有効だが耐性出現・副作用・投与方法に問題が残る既存薬とは異なる作用機序をもつ新規薬剤の開発

方法と成果

1. レポーター細胞で9600化合物検索

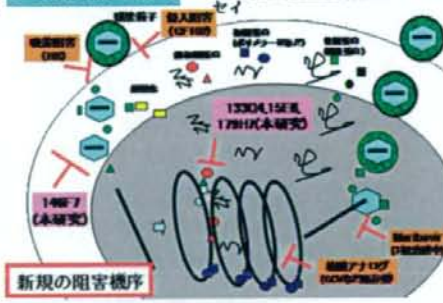


2. ブラーク形成・免疫染色等による確認



	EC50 (μM)		
	ヒトCMV	モルモットCMV	マウスCMV
146F7	2.5±0.2	6.2±1.7	3.0±1.6
GCV	1.4±0.2	25.9±7.7	5.7±0.5

3. 作用機序の解明



4. 動物モデルでの評価(進行中)

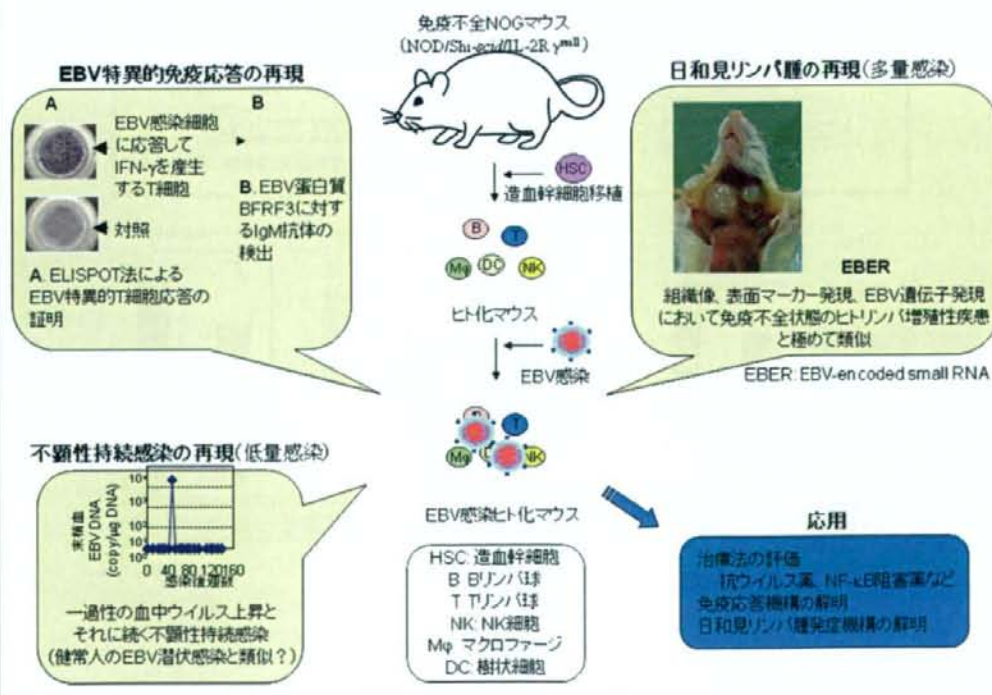
- 1) 乳のみマウスへのマウスCMV接種
- 2) マウスの脳内接種
- 3) モルモットCMV(GPCMV)の皮下及び腹腔接種

5. 個体での増殖にのみ必要なGPCMV遺伝子同定

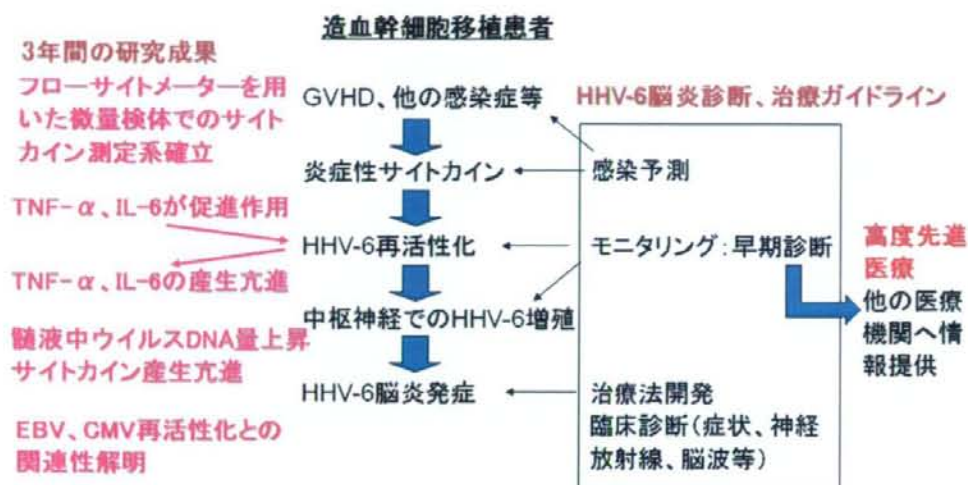
今後の課題

- 1) 146F7などの実用化の可能性の検討
- 2) 感染動物のin vivoイメージングによる迅速な評価系の建立
- 3) 解析中の粗造化合物の作用機序解明と構造活性相関
- 4) 薬剤耐性株の選別と耐性遺伝子の同定
- 5) 他のウイルスへの効果の検討

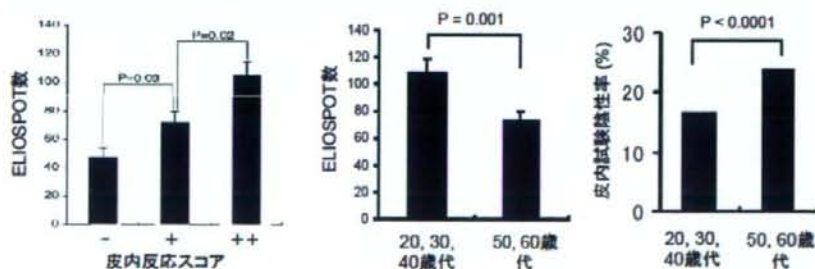
ヒト化マウスを用いたEBウイルス(EBV)感染症発生機序と治療法に関する研究



造血幹細胞移植後HHV-6脳炎の診断治療ガイドライン作成



水痘帯状疱疹ウイルス特異的細胞性免疫能の測定法



皮内反応スコアとELISPOT試験において正の相関が認められた。

○研究代表者の研究歴等・過去に所属した研究機関の履歴

大阪大学医学部・眼科学講座

大阪大学大学院医学系研究科・微生物学講座

Erlangen 大学医学部・ウイルス学研究所 (ドイツ)

(独)医薬基盤研究所・基盤研究部

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

真鍋禮三 (現大阪大学名誉教授)

田野保雄 (現大阪大学大学院医学系研究科教授)

井上幸次 (現鳥取大学医学部教授)

Bernhard Fleckenstein (現ドイツ Erlangen 大学医学部教授)

山西弘一 (現医薬基盤研究所理事長)

・主な研究課題

ヒトヘルペスウイルス(特に HHV-6 および VZV) の病原性発現機序解明に関する研究

ウイルス特異的免疫能とウイルス再活性化の機序解明に関する研究

水痘生ワクチンを用いた新世代ワクチン開発およびワクチン用新規アジュバントの開発に関する研究

・これまでの研究実績

英文原著

1. *Role of dendritic cells infected with human herpesvirus 6 in virus transmission. Virology, in press.*
2. Human herpesvirus-6 induces MVB formation and virus egress occurs via an exosomal release pathway. *Traffic* 9:1728-1742. 2008.
3. *Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity - Comparison of VZV-skin test and interferon-gamma ELISPOT assay. J Infect Dis* 198:1327-1333. 2008.
4. Human herpesvirus-6 infection induces the reorganization of membrane microdomains in target cells, which are required for virus entry. *Virology* 378:265-271. 2008.
5. Varicella-zoster virus ORF 1 gene product is a tail-anchored membrane protein localized to plasma membrane and trans-Golgi network in infected cells. *Virology* 377:289-95. 2008.
6. Varicella-zoster virus ORF 58 gene is dispensable for viral replication in cell culture. *Virol J.* 5:54. 2008.
7. Varicella-zoster virus glycoprotein M homolog is glycosylated, is expressed on the viral envelope, and functions in virus cell-to-cell spread. *J Virol* 82:795-804. 2008.
8. Single dose of inactivated Japanese encephalitis vaccine with poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles provides effective protection from Japanese encephalitis virus. *Vaccine* 26:589-94. 2008.
9. The viral interferon-regulatory factor-3 is required for the survival of KSHV-infected primary effusion

lymphoma cells. *Blood* 111:320-7. 2008.

10. Influenza hemagglutinin vaccine with poly(γ -glutamic acid) nanoparticles enhances the protection against influenza virus infection through both humoral and cell-mediated immunity. *Vaccine* 25:8270-8. 2007.
11. Deletion in open reading frame 49 of varicella-zoster virus reduces virus growth in human malignant melanoma cells but not in human embryonic fibroblasts. *J Virol* 81:12654-65. 2007.
12. Generation of a recombinant Oka varicella vaccine expressing mumps virus hemagglutinin-neuraminidase protein as a polyvalent live vaccine. *Vaccine* 25:8741-55. 2007. (*; equal contribution)
13. Reciprocal roles of cellular chemokine receptors and human herpesvirus 7-encoded chemokine receptors, U12 and U51. *J Gen Virol* 88:1423-8. 2007.
14. Human herpesvirus 7 infection increases the expression levels of CD46 and CD59 in target cells. *J Gen Virol* 88:1415-22. 2007.
15. Cloning of full length genome of varicella-zoster virus vaccine strain into a bacterial artificial chromosome and reconstitution of infectious virus. *Vaccine* 25:5006-12. 2007.
16. Human herpesvirus 7 U47 gene products are glycoproteins expressed in virions and associate with glycoprotein H. *J Gen Virol* 87:501-8. 2006.
17. Human herpesvirus 6 envelope cholesterol is required for virus entry. *J Gen Virol* 87:277-85. 2006.

英文著書

1. Human herpesvirus 6 and 7. In Knipe, DM, and Howley, PM, Editors, *Fields Virology* Fifth edition, p2819-2845 Lippincott Williams and Wilkins, 2007
2. HHV-6A, 6B and 7: pathogenesis, host response, and clinical disease. In Arvin A, Campadelli-Fiume C, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whiteley R and Yamanishi K, Editors, *Human herpesviruses*, p833-842 Cambridge 2007
3. Proteins of HHV-6. In Kruger, G, and Ablashi, D, Editors, *Human herpesvirus-6 second edition*. p47-57 Elsevier, 2006.

特許出願

1. 明石 満、森 康子、岡本成史、山西弘一、高橋理明、赤木隆美(発明人)インフルエンザワクチン用アジュバントおよびインフルエンザワクチン 特願 2006-271273 出願日 2006年10月2日

・平成 21 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規研究課題の応募状況

応募中 応募研究課題: 移植医療に関連して発生する感染症の予防と治療に関する研究

臓器移植や悪性腫瘍による免疫低下状態で発生するウイルス感染症の予防と治療に関する研究

研究代表者 森 康子
(神戸大学大学院医学研究科)

研究分担者 (9名)

吉川 晋史 (藤田保健衛生大)
水口 裕之 (医薬基礎研究所)
藤原 成悦 (国立成育医療センター研究所)
白木 公康 (富山大学)
井上 直樹 (国立感染症研究所)
米松 佐知子 (医薬基礎研究所)
近藤 一博 (慈恵医大)
羽田 敦子 (北野病院)
長谷川 秀樹 (国立感染症研究所)

背景

近年、臓器移植が行われるようになり、日和見とされていたヘルペスウイルスが、再活性化し、それらのウイルス感染症によって致死的となる例が観察される。

- ・ ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)、ヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)
脳炎、肺炎、網膜炎
- ・ 単純ヘルペスウイルス(HSV)、
水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)
薬剤耐性ウイルスの出現および重篤な感染症
- ・ EBウイルス(EBV)
リンパ増殖性疾患
- ・ 原疾患は治癒しても難治性のウイルス感染症によって致死的となる。

目的

- ・ 免疫低下状態で発生するヘルペスウイルス感染症の病態解明を行い、ウイルスの再活性化の早期診断、予防および治療法開発のための基礎を確立することを目的とする。

成果報告

1. 水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)特異的細胞性免疫能の群集系の確立、再活性化の早期診断、予防法の開発に繋げる (森 康子)。
2. 臓器移植後ヒトヘルペスウイルス6(HHV-6)脳炎の診断、治療ガイドライン作成、患者の予後改善に大きく寄与する(吉川 晋史)。
3. 薬剤耐性ウイルスの性状・薬剤感受性の検討と未承認抗ウイルス薬の有効性・臨床効果の確認 (白木公康)。
4. サイトメガロウイルス(CMV)及び水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)に対する新規薬剤の探索。リード化合物としての可能性を明らかにする(井上直樹)。

1. 水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)に対する細胞性免疫能の測定法の確立

背景

- ・ 水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)は、初感染時に水痘として高率に発症し、終生宿主の知覚神経節に潜伏感染する。
- ・ 免疫抑制に伴って再活性化し帯状疱疹を発症することが示されている。免疫不全者で発症した帯状疱疹は、重篤であり、時には致死的となる。

↓
早期診断法、予防法の開発

水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)に対する感染防御効果は細胞性免疫応答を主とする。

VZV特異的な細胞性免疫と帯状疱疹発症との関与

現在、VZVに対する細胞性免疫の測定方法としては、

1. 皮内テスト (日本)
2. IFN-γ ELISPOT法 (米国)

これらを比較検討した報告はない

糖尿病患者においては帯状疱疹を発症し易い傾向にあり、また一旦発症すると遷延化する傾向にある

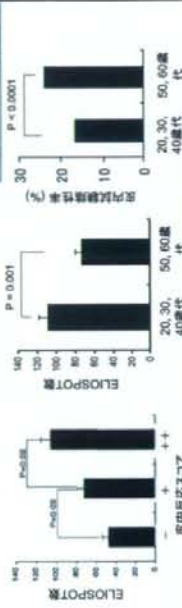
糖尿病ランディアンと糖尿病患者におけるVZV特異的な細胞性免疫応答をIFN-γ ELISPOT法により比較検討

	糖尿病患者	健康人
検体総数	63	67
平均年齢 (年齢幅)	57.3 (41-79)	56.2 (40-77)
年齢別検体数		
40-49	13	15
50-59	23	29
60-69	23	22
70-79	3	1
性別検体数		
男性	44	45
女性	19	22

水痘帯状疱疹ウイルス特異的細胞性免疫能の測定法

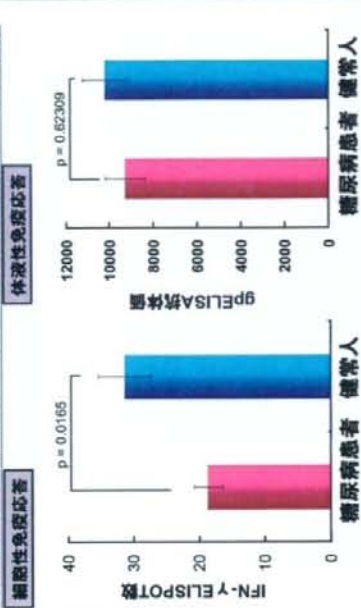


J. Infectious Dis, 2008



皮内反応スコアとELISPOT試験において正の相関が認められた。

糖尿病患者と健康人との間におけるVZVに対する免疫応答の比較



糖尿病患者はVZVに対する細胞性免疫応答が有意に低下している

今後の課題

- ・VZV特異的免疫とウイルス再活性化および帯状疱疹症の関連性の解析による早期診断、予防法開発。

2. 造血幹細胞移植後ヒトヘルペスウイルス-6(HHV-6) 脳炎の診断治療ガイドライン作成

病態解明



目的: 移植後HHV-6脳炎の病態解明とそれに基づく診断治療ガイドライン作成

病態解明

フローサイトメーターを用いた微量抗体検出でのサイトカイン測定系確立

TNF- α , IL-6が促進作用

TNF- α , IL-6の産生亢進

髄液中ウイルスDNA量上昇

サイトカイン産生亢進

治療法確立

ガンシクロビル, フォスカルネット(抗ウイルス剤)の早期投与

造血幹細胞移植後ヒトヘルペスウイルス-8(HHV-8)脳炎の診断治療ガイドライン作成

研究結果



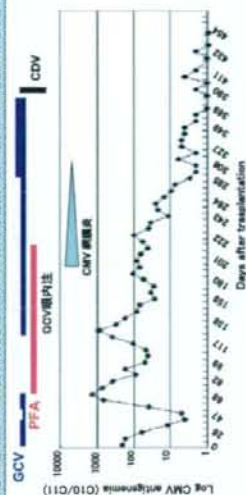
今後の課題

1. 臨床像の解析
2. ガイドラインの整備
3. 高度先進医療 他の医療機関へ情報提供

J. Infection, 2008
Liver transplantation, 2008

3. 薬剤耐性株 (ガンシクロビル-フォスカルネット耐性CMV株) の分離と薬剤感受性試験

骨髄移植患者の発症CMV感染症に対するガンシクロビル (GCV) とフォスカルネット (PFA) による治療において薬剤耐性株の出現した。薬剤感受性測定と薬量濃度低下の測定から、シトフォビル (CDV) が有効であると考えられ、CDV治療で検出された薬剤耐性株を分離した。薬剤耐性のCMV株の分離が有効であったと報告



分離ウイルスの薬剤感受性試験 IC50 (μ g/ml)

抗ウイルス剤	Townes株	分離株	J. Med. Virology, 2008
GCV	0.66±0.05	4.54±1.03	
CDV	0.11±0.05	0.20±0.05	
PFA	13.9 ±3.1	>100	

今後の課題

- ・他の免疫不全患者から分離された薬剤耐性株の機序について検討する
- ・慢性CMV感染症患者での薬剤耐性ウイルスに対するシドフォビルの有効性から、CMV感染症に対する未承認薬の承認につなげたい

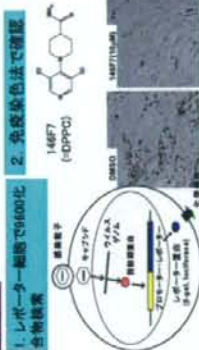
4. サイトメガロウイルス(CMV)及び水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)の新規抗ウイルス薬の検索

研究目的

- ・既存の抗ヘルペスウイルス薬は有効であるが、耐性株の出現、副作用の問題がある。
- ・作用機序の異なる新規薬剤の開発が、求められている。
- ・新規薬剤を探索し、リード化合物としての可能性を明らかにする。

研究成果

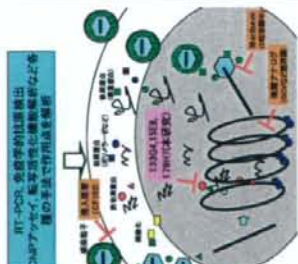
3. プラーク減少法で効果濃度を決定



VZV, CMVに対し50%効果濃度 (EC50) が50 μM以下の化合物を各々数種同定

50%阻害に必要な薬剤濃度 (EC50) を決定した。(例: 146F7)

従って、146F7は、
1) 既存薬OCV生みの濃度で効果
2) 細胞毒性なし (CC50>100 μM)
3) 動物CMVでも効果



研究成果

3. 作用機序の解明

- 1) 146F7は、ウイルス遺伝子発現前の過程という新規機序でCMV増殖を阻害する。
- 2) 133G42と3化合物は、CMV及びVZVの前初期蛋白による遺伝子活性化に関与する宿主因子を標的とする

4. 動物モデルでの評価(進行中)

- 1) マウスへのマウスCMV接種
- 2) マウスの脳内接種
- 3) モルモットCMVの皮下及び腹腔接種

Antimicrob Agents
Chemother, 2008
Virology, 2008

今後の課題

1. 146F7などの実用化の可能性を検討
2. 感染動物による迅速な評価系を確立
3. 解析途中の阻害化合物の作用機序解明
4. 薬剤耐性株の選択と耐性遺伝子の同定
5. 他のウイルスへの効果の検討

平成20年度 新興・再興感染症研究事業 成果概要

研究課題：リケッチア感染症の国内実態調査および早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築

課題番号：H18-新興-一般-014

研究代表者：岸本 壽男

I. 研究の意義

- (1) リケッチア感染症の国内における実態には不明な点が多い。
- (2) リケッチア感染症の早期診断体制は未整備であり確立されていない。
- (3) リケッチア感染症の早期警鐘システムの構築が求められている。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) リケッチア感染症のサーベイランスを評価し改善する。患者、リケッチア、ダニ、媒介動物の実態解明を進展させ、リケッチア感染症への迅速な対応につなげる。
- (2) 早期診断法と、リファレンス体制確立で、各地域における早期警鐘システムの構築が可能となる。
- (3) 患者の病態解析、重症化の機序解明、治療薬の作用機序の詳細な検討で、より有効な治療、予防法の確立が期待でき、救命率も向上する。
- (4) 医療関係者や一般社会への適切な情報提供と啓発で、リケッチア感染症の発生や重症化を予防。

III. 3年間の研究成果

・研究代表者(岸本壽男)

疫学的研究、検査・診断的研究、予防・治療の研究を3本柱として本研究を立案、自らも研究分担者との疫学調査や臨床検討に協働しつつ総合的に研究を進められるように調整し、総括した。

・研究分担者(高田伸弘)

ダニ類と保有リケッチア菌種の多様性に関する実態調査:日本紅斑熱について全国で詳細な実態調査をし、リケッチア症発生の環境要因を考察した。つがが虫病については、一部の分布相、生息範囲の線引きができた。新規の紅斑熱について、基礎的な資料を得た。また南西諸島方面の実態把握を進め、東アジア共通リケッチア症の感染源の実態の一部を韓国済州島で調査した。

・研究分担者(藤田博己)

(1) 国内各地のマダニ類のリケッチア保有状況を分離にて調査し、保有状況や分布の解明を進展させた。(2) 新規の紅斑熱リケッチア(*Rickettsia heilongjiangensis*)によるヒト感染国内初発例を明らかにした。(3) マダニ試料からのリケッチア分離マニュアルの試案を作成した。(4) マダニ幼若期の形態学的鑑別を目的に図説を作成した。

・研究分担者(猪熊 壽)

(1) 伴侶動物のリケッチア類感染状況調査を行い、その中でイヌの日本紅斑熱の宿主としての可能性を検討したが、全国のイヌからの遺伝子検出では全頭陰性で、また免疫抑制犬に対する感染実験でも病原性は低く、宿主としての関与は否定的であった。またイヌのエーリキアおよびアナプラズマ感染に関する疫学調査では、高い陽性率が示された。(2) 家畜の調査を行い、沖縄県の牛でアナプラズマ感染症の牛を症例報告した。北海道の牛放牧地におけるマダニからアナプラズマの遺伝子断片が検出され、これらのマダニがベクターである可能性が示唆された。(3) 野生動物については北海道のアライグマでエーリキアおよびアナプラズマの関与が抗体と遺伝子検出で示唆された。

・研究分担者(岡部信彦)

リケッチア感染症のサーベイランス改善に関する研究として、九州、四国の医療機関を対象につがが虫病と日本紅斑熱のサーベイランスの認知度と診断・報告状況の調査を行った。地域による差や複数回の調査での認知度向上等がみられ、さらなる啓発の重要性が示唆された。一般住民におけるリケッチア症の認知度調査では、医療福祉関連者でも認知度は低く、リケッチア症への啓発の必要性が示唆された。

・研究分担者(大橋典男)

(1) 国内におけるリケッチア関連細菌群の実態把握:鹿児島県で新型の紅斑熱群リケッチアを見出した。また、鹿児島県のタカサゴキラマダニから初めて *A. phagocytophilum* を検出した。また紀伊半島のマダニが多種の紅斑熱群リケッチアを保有することを示した。また与那国島、長崎県五島列島で

マダニの調査を行い、アナプラズマを検出した。(2)ヒトアナプラズマ症の初確認:高知県で日本紅斑熱が疑われた患者保存血液の解析で、ヒトアナプラズマ症を国内で2例初確認した。さらに、鹿児島県のタカサゴキラマダニと高知県の患者から検出された遺伝子群が同一配列を持つことが判明し、本症の媒介マダニのひとつと考えられた。(3)Multiplex real-time RT-PCRによるリケッチア症の診断法の検討では、特異性、感度が高く、特につが虫病については早期確定診断法としての有用性が示された。

・研究分担者(古屋由美子)

(1)地域におけるリケッチア症患者の実態調査(東海・関東地域):神奈川県におけるつが虫病の主な感染株(約7割)はKawasaki株であることを示した。(2)リケッチア症の迅速診断法の開発と地方衛生研究所の診断体制調査:つが虫病患者の痂皮は遺伝子検査材料として有効であることが示された。東海関東以北地域の18カ所の地方衛生研究所におけるリケッチア感染症の検査診断体制について調査し、不十分な実態を明らかにした。(3)PCRによる*O. tsutsugamushi* DNA検出法の開発:従来のPCRで唯一検出不能であったShimokoshi typeも検出できる新たなプライマーを設計しPCRを確立した。

・研究分担者(倉田毅)

(1)地域におけるリケッチア症の実態調査(東海・北陸地域):富山県内の浸淫状況を調査するため、野生げっ歯類およびマダニ類の調査を行い患者の発生と関連する知見を積み重ねた。

(2)東海北陸ブロック内の疫学情報及び検査体制の調査:ブロック内の自治体の疫学情報および検査体制を調査した。つが虫病は全ての県で発生していたが、日本紅斑熱は地域差があった。検査体制については充分整っている県は半数に過ぎず、今後、流行地における疫学調査及び検査の連携が必要と考えられた。

・研究分担者(田原研司)

(1)地域におけるリケッチア症の実態調査(中国・四国地域):患者、ベクター、動物のリケッチア症の実態調査を継続して行い把握が進んだ。その中で島根半島西部地域のダニ相がニホンシカの生息域と密接に関連しており、*R. japonica*の保有率も東部に比べ極端に高く、日本紅斑熱患者の発生の集中要因に大きく関与していると示唆された。(2)発生予防のための地域住民への啓発:島根県内における住民・医療機関・行政機関等へリスクコミュニケーションを実施し、発生予防の啓発・警鐘を行った。

(3)刺し口(痂皮)を用いたPCR法の有用性:日本紅斑熱に関しては、各種検体との比較で痂皮が最も適しており、治療後も有用性が示された。

・研究分担者(山本正悟)

(1)地域におけるリケッチア症の実態調査(九州・沖縄地域):実態把握が進んだなか、日本紅斑熱は新たに福岡県、長崎県、熊本県での発生が確認され、特に熊本県の天草地域が多発地区であることが判明した。つが虫病も、沖縄県で初発例の報告があった。また九州におけるヤマアラシチマダニのベクターとしての重要性が示唆された。(2)九州沖縄地域における診断支援体制の構築を行った。(3)刺し口(痂皮)を用いたPCR法の有用性を日本紅斑熱のみならず、つが虫病でも確認した。

・研究分担者(安藤秀二)

(1)リケッチア症患者発生地での現地疫学調査を協働で実施した。仙台市では、国内で初の新規紅斑熱群リケッチア *R. heilongjiangensis* による患者の発生を、患者、媒介動物(マダニ、野鼠)から裏付けた。(2)鳥に関連するマダニ類からのリケッチア類の網羅的検出:山階鳥類研究所の多大な協力により鳥類に感染するマダニ類とリケッチア類の地域分布と多様性を示す膨大なデータが蓄積された。(3)国内のリケッチア感染症検査法の検証:従来の血清診断法の一部で特異性、感度の問題を明らかにした。また、遺伝子検出法においても、供試検体による検出率の低下の問題と、痂皮、紅斑部皮膚材料の有効性等を示した。(4)キャリアオーバー等の問題を解決するために、遺伝子組み換え技術を用いたつが虫病遺伝子診断用の陽性コントロールを作製した。

・研究分担者(川端寛樹)

(1)ペプチド抗体の作成と評価:病理組織でのリケッチア感染証明に利用することを目的に、RickA抗原に注目してペプチド抗体を作製した。*R. japonica*感染L-929細胞(ホルマリン固定)での評価では、特異的な染色像は見いだされなかった。(2)海保らによって過去に作成、保存されていたモノクローナル抗体の特異性についてウエスタンブロット法によって調べたが、一部を除き特異的な反応は見いだされず抗原同定にはいたらなかった。これらは今後の新規作成と検討を要する。

・研究分担者(堤寛)

(1)日本紅斑熱の早期診断法の確立のため、皮膚生検(刺し口、皮疹部)のホルマリン固定パラフィン切片による酵素抗体法とReal-time PCR法の有用性と、ヒト症例へ応用を検討し、両法を併用することにより、診断の有用性が高まった。(2)日本紅斑熱の剖検例のReal-time PCR解析で、諸臓器のパラフィン切片から日本紅斑熱リケッチアDNAが同定された。イヌならびにヌードマウスを用いた感染実験では、日本紅斑熱リケッチアを皮下ならびに腹腔投与して観察したが、本菌のこれら動物への強い病原性は証明されなかった。

・研究分担者(岩崎博道)

重症化機序の解明と診断治療への応用:重症度の評価が可能かつ虫病および日本紅斑熱患者を対象とし、病態解析と経時的な血中サイトカイン測定を実施した。重症度スコアとの相関を含み、TNF- α がいずれのリケッチア感染症においても重症度を予測するために有用な指標となることが示唆された。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 報告症例の激増と死亡例発生がみられる日本紅斑熱への緊急的な総合的対策
- (2) 新規の紅斑熱リケッチア症、ヒトアナプラズマ症の実態解明と診断体制の構築
- (3) 発疹熱などの輸入リケッチア症への対応策
- (4) 生態系からみたリケッチアの環境中での存在様式の解明と、感染リスクの解明
- (5) 不明な点が多いリケッチア症の発症や重症化の病態、免疫応答、共感染時の病態についての多施設間臨床的研究と動物実験等での検討
- (6) 基礎的研究として、発症や重症化のメカニズム解析、病原体の感染・細胞内増殖・病原性発現の分子機構の解明、細胞レベルでの免疫応答解析へのゲノム情報の応用
- (7) リファレンスネットワークの構築に向けた菌株、陽性コントロール血清の収集とリスト作成、人材育成のためのワークショップ等の企画実施
- (8) 医療関係者、行政、メディア、一般社会への適切な情報提供と、啓発による感染予防対策

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) リケッチア感染症は死に至りうる疾患であるが、一般検査機関で扱うことが困難な病原体でもあり、本研究の成果は、感染研・地衛研での診断体制構築、維持強化に貢献できる。
- (2) 新型紅斑熱リケッチア症、ヒトアナプラズマ症、輸入リケッチア症などへの対策の整備立案、感染症法改定への提言で厚生労働行政に寄与できる。
- (3) リケッチア感染症への総合的対策により国民の保健・医療・福祉の向上、健康維持に貢献できる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者(岸本)

- (1) Uchiyama T, Ogawa M, Kishi M, Yamashita T, Kishimoto T, Kurane I.: Restriction of the growth of typhus group rickettsiae in tick cells. Clin Microbiol Infect. (in press)
- (2) Ogawa M, Shinkai-Ouchi F, Uchiyama T, Hagiwara K, Hanada K, Kurane I, Kishimoto T.: Shotgun proteomics of *Orientia tsutsugamushi*. Clin Microbiol Infect. (in press)

研究分担者(高田)

- (1) Ishiguro F, Takada N, Fujita H, Noji Y, Yano Y, Iwasaki H.: Survey of the vectorial competence of ticks in an endemic area of spotted fever group rickettsioses in Fukui Prefecture. Microbiol Immunol. 2008;52:305-309.

研究分担者(藤田)

- (1) Fujita H, Takada N, Kawabata H, Ishiguro F, Yamamoto S, Oikawa Y, Yano Y, Ma XH, Oh HS.: Some suggestive records of rickettsiae isolated from ticks in Korea and central China. Annu Rep Ohara Hosp. 2007;47:21-24.
- (2) Fujita H, Kadosaka T, Nitta Y, Ando S, Takano A, Watanabe H, Kawabata H.: Rickettsia sp. in *Ixodes granulatus* ticks, Japan. Emerg Infect Dis. 2008;14:1963-1965.

研究分担者(猪熊)

- (1) Tamamoto C, Seino N, Suzuki M, Kaji K, Takahashi H, Inokuma H.: Detection of *Ehrlichia muris* DNA from sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Hokkaido, Japan. Vet Parasitol. 2007;150:370-373.
- (2) Ooshiro M, Zakimi S, Matsukawa Z, Katagiri Y, Inokuma H.: Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* from cattle on Yonaguni Island, Okinawa, Japan. Vet Parasitol. 2008;54(3-4):360-364.
- (3) Jilintai, Seino N, Matsumoto K, Hayakawa D, Suzuki M, Hata H, Kondo S, Yokoyama N, Inokuma H.: Serological and molecular survey of *Rickettsia* infection in cattle and sika deer in a pastureland in Hidaka district, Hokkaido, Japan. Jpn J Infect Dis. 2008;61(4):315-317.
- (4) Inokuma H, Seino N, Suzuki M, Kaji K, Takahashi H, Inoue S.: Detection of *Rickettsia helvetica* DNA from peripheral blood of sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. J Wildl Dis. 2008;44(1):164-167.

研究分担者(岡部)

松井珠乃、佐藤弘、岡部信彦、安藤秀二、岸本寿男、尹 浩信、坂崎善門、瀬戸山充、成田博実: 熊本県、宮崎県の皮膚科医におけるつつが虫病、日本紅斑熱のサーベイランス認知度と、2005年における診断・届出の現状。日本皮膚科学会雑誌。2007;117:1977-1979.

研究分担者(大橋)

- (1) Inoue K, Maruyama S, Kabeya H, Yamada N, Ohashi N, Sato Y, Yukawa M, Masuzawa T, Kawamori F, Kadosaka T, Takada N, Fujita H, Kawabata H.: Prevalence and genetic diversity of *Bartonella*

species isolated from wild rodents in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:5086-5092.

(2) Masuzawa T, Kharitonov IG, Okamoto Y, Fukui T, Ohashi N.: Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and its coinfection with *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks inhabiting Tver Province (Russia) - a sympatric region for both tick species. *J Med Microbiol.* 2008;57:986-991.

(3) Naitou H, Kawaguchi D, Nishimura Y, Inayoshi M, Kawamori F, Masuzawa T, Hiroi M, Kurashige H, Kawabata H, Fujita H, Ohashi N.: Molecular identification of *Ehrlichia* species and 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis') from ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, Japan. *Microbiol Immunol.* 2006;50: 45-51.

研究分担者(古屋)

(1) 古屋由美子、片山丘 神奈川県におけるつつが虫の発生状況(平成18年度)神奈川県報告2007 37:78-80

研究分担者(田原)

(1) Tabara K., Arai S, Kawabuchi T, Itagaki A, Ishihara C, Satoh H, Okabe N, Tsuji M: Molecular Survey of *Babesia microti*, *Ehrlichia* Species and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in Wild Rodents from Shimane Prefecture, Japan; *Microbiol. Immunol.*, 51(4), 359-367, 2007

(2) 田原研司, 山本正悟: 多種多彩なつつが虫病ダニと新興再興感染症. *ダニと新興再興感染症(SADI 組織委員会編)* 2007;151-164. 全国農村教育協会, 東京

(3) 矢野泰弘, 田原研司, 保科健, 板垣朝夫, 藤田博己, 角坂照貴, 川端寛樹, 高田伸弘: 島根県におけるツツガムシの分布調査-ツツガムシ病発生相と関連して-. *大原総合病院年報.* 2007;47:7-10.

研究分担者(山本)

(1) Koizumi N, Muto M, Yamamoto S., Baba Y, Kudo M, Tamae Y, Shimomura K, Takatori I, Iwakiri A, Ishikawa K, Soma H, Watanabe H.: Investigation of reservoir animals of *Leptospira* in the northern part of Miyazaki prefecture. *Jpn J Infect Dis.* 2008;61(6):465-8.

研究分担者(安藤)

(1) Nomura T, Fujimoto T, Ebisutani C, Horiguchi H, Ando S.: The First Fatal Case of Japanese Spotted Fever Confirmed by Serological and Microbiological Tests in Awaji Island, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2007;60:241-243.

研究分担者(川端)

(1) Saito K, Ito A, Asashima N, Ohno M, Nagai R, Fujita H, Koizumi N, Takano A, Watanabe H, Kawabata H.: Case report: *Borrelia valaisiana* infection in a Japanese man associated with traveling to foreign countries. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:1124-1127.

(2) Takano A, Ando S, Kishimoto T, Fujita H, Kadosaka T, Nitta Y, Kawabata H., Watanabe H.: Novel *Ehrlichia* sp. found in *Ixodes granulatus* infested to rodents in Okinawa, Japan. *Microbiol Immunol.* (in press)

研究分担者(堤)

(1) Tsutsumi Y.: Histopathological diagnosis of infectious diseases using patients' sera. *Semin Diagn Pathol.* 2007;24(4):243-252.

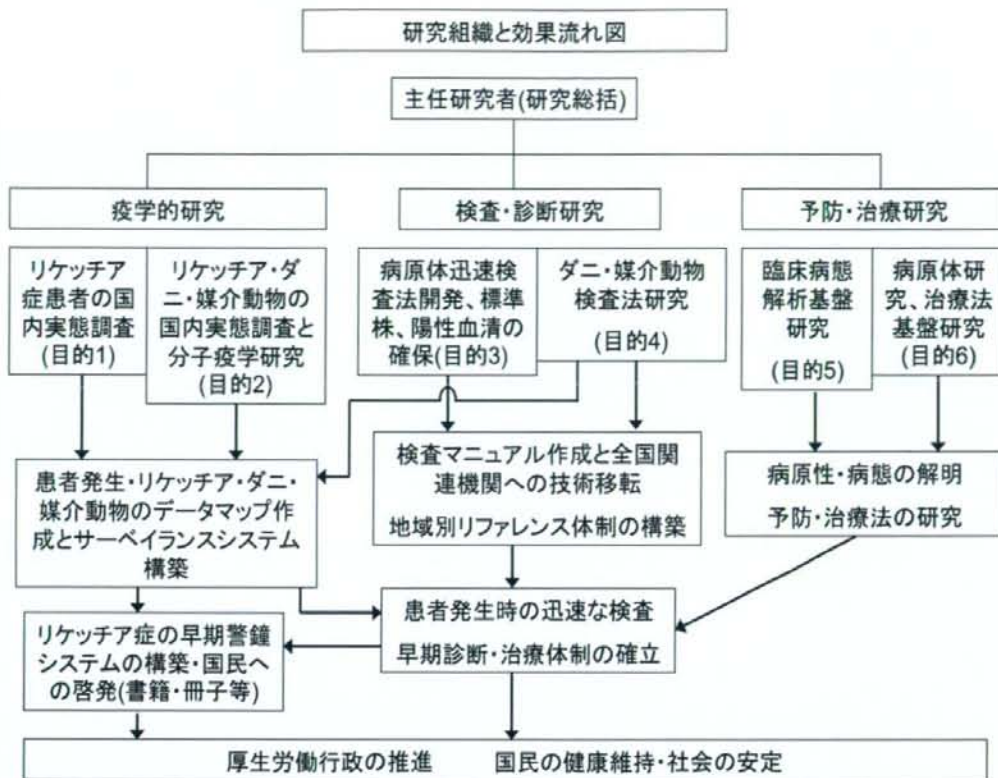
(2) 堤 寛、鈴木 舞、塩籠和也、堀口英久、佐野壽昭、馬原文彦: 日本紅斑熱の病理。「ダニと新興再興感染症」(監修: 柳原保武) 2007;119-128. 全国農村教育協会, 東京

研究分担者(岩崎)

(1) Ishiguro F, Takada N, Fujita H, Noji Y, Yano Y, Iwasaki H.: Survey of the vectorial competence of ticks in an endemic area of spotted fever group rickettsioses in Fukui Prefecture. *Microbiol Immunol.* 2008;52:305-309.

VII. III (3年間の研究成果)の概要図等

以下の流れ図に沿って研究が行われた。



以下にこの3年間の研究課題と、今後の課題について図示した。

3年間の検討課題**疫学的研究**

- ・サーベイランスの評価・改善への調査
- ・つがが虫病、日本紅斑熱の全国のヒト・ベクター・動物の実態把握
- ・新規紅斑熱リケッチア症、ヒトアナプラズマ症の初確認と調査
- ・輸入リケッチア症例の経験と対応

検査・診断研究

- ・早期・迅速診断法の開発
- ・リファレンス体制の構築

予防・治療研究

- ・臨床病態解析と治療法の開発
- ・リケッチア感染症に関する啓発・広報

今後の課題

- ・サーベイランス改善、感染症法への提言
- ・実態把握の継続、拡大とリスクマップ作成(GIS利用)への具体化
- ・新規紅斑熱リケッチア症、ヒトアナプラズマ症のヒト・動物・ベクター・病原体の実態解明と、病態解析、診断、治療予防法の確立
- ・輸入リケッチア症への対策

- ・早期・迅速診断法の実用化と普及
- ・リファレンス体制確立に向けたネットワーク構築とリファレンス作成、ワークショップ等の開催

- ・多施設間での症例蓄積による病態解析の探求と、基礎研究での裏づけ
- ・国民への啓発をリスクコミュニケーション等を参考に、書籍、冊子、メディア等での広報発信

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

1980年 川崎医科大学卒業
 1987年 同大学院入学
 1991年 医学博士、同大呼吸器内科講師
 1993年 米国シアトル、ワシントン大学病原微生物学に客員研究員として留学
 1994年 帰国後、同大学呼吸器内科講師
 2000年より 国立感染症研究所ウイルス第一部第5室室長。現在に至る。

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

副島林造、松島敏春、松本 明、Cho chou Kuo 各教授に指導を受ける。主な現在の共同研究者：倉根一郎、安藤秀二、山田章雄、佐多徹太郎、尾内一信、吉川泰弘、本研究班の各位

・主な研究課題

リケッチアおよびクラミジアの疫学、診断、治療、予防に関する研究

・これまでの研究実績

最近の競争的資金取得：研究代表者：厚生科研費（新興・再興）リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築 2006-2008

研究分担者：厚生科研費（新興・再興）3件、厚生科研費（難治性疾患克服研究事業）1件

(1) Yamazaki T, Takemura H, Inoue M, Ogawa M, Ando S, Sato K, Kishimoto T.: The intracellular accumulation of phagocytic and epithelial cells and the inhibitory effect on *Chlamydia* (*Chlamydia*) *pneumoniae* of Telithromycin and comparator antimicrobials. J Chemother. 2008;20:428-430.

(2) Hisada H, Yamazaki T, Inoue M, Sato K, Ando S, Kishimoto T.: In vitro Activity of Garenoxacin against *Chlamydia* spp. J Chemother. 2008;20:282-284.

(3) Matsui T, Nakashima K, Ohyama T, Kobayashi J, Arima Y, Kishimoto T., Ogawa M, Cai Y, Shiga S, Ando S, Kurane I, Tabara K, Itagaki A, Nitta N, Fukushi H, Matsumoto A, and Okabe N.: An outbreak of psittacosis in a bird park in Japan. Epidemiol Infect. 2008;36:492-5.

・平成21年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業への新規研究課題の応募状況

継続厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）動物由来感染症の生態学的アプローチによるリスク評価等に関する研究(3年目)(研究代表者 山田章雄)研究分担者として応募予定

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業研究発表会(3年目)

「リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制
の確立による早期警鐘システムの構築」班

研究代表者 岸本勇男 (国立感染症研究所ウイルス第一部室長)

- 研究分担者 安藤勇二 (国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官)
 猪俣 壽 (徳島大学医学部医学部教授)
 岩崎博道 (徳井大学医学部流病疫学)
 大崎英男 (静岡国立大学環境科学研究所教授)
 岡部隆彦 (国立感染症研究所感染症情報センター長)
 川崎聖寿 (国立感染症研究所細菌学第一部室長)
 倉田 毅 (岡山県衛生研究所所長)
 高田祐弘 (徳井大学医学部流病疫学)
 垣田研司 (鳥取県健康福祉科学研究所主任研究員)
 津 寛 (徳田保健衛生大学感染症部付属感染症学主任研究員)
 藤田智己 (山形本県総合総合衛生研究所主任研究員)
 石黒由美子 (神奈川県衛生保健研究所生物部専門研究員)
 山本正徳 (岩崎県衛生保健研究所ウイルス部部長)
 研究発表者 庄 山陽県研究所

リケッチア感染症の現状

- つつが虫病は、年間数百例で推移しており、死亡例も毎年報告。
- 日本紅斑熱は、数十例程度であったが、2001年以降、急激に増加し、2007年8例と倍増、死亡例も近年相次いで報告。
- 輸入感染症として、東南アジアからのつつが虫病、紅斑熱、発疹熱、ヨーロッパからの地中海紅斑熱、アメリカ大陸からのロッキーマウンテン山紅斑熱等の発生の可能性。
- 海外で問題となっているエリキア感染症、アナプラズマ感染症については、国内実態は不明。

<リケッチア感染症の課題>

- 国内における実態には不明な点が多い。患者、病原体、ベクター、動物について総合的に把握、解析する体制を整える。
- 輸入例を含む国内のリケッチア感染症患者を正確に診断、把握し、治療・予防対策をする。

主なリケッチア性疾患と関連疾患

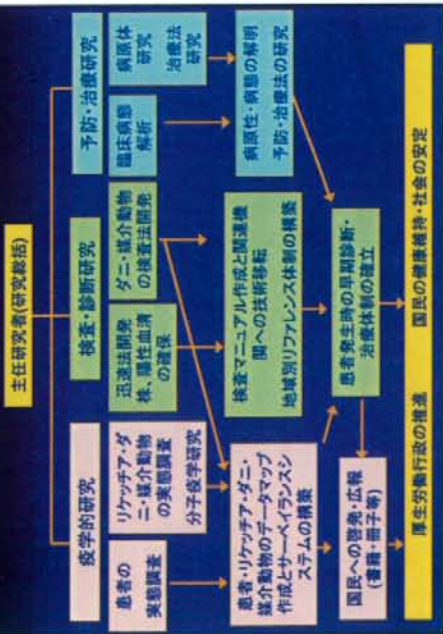
病原体	宿主	媒介	流行地	ベクター
リケッチア菌 (リケッチア属) (革陽性バクテリア)	<i>Rickettsia prowazekii</i>	ダニ科ツメムシ	世界各地	ノコシ
	<i>R. typhi</i>	ダニ科	世界各地	ノコシ
	<i>R. japonica</i>	日本紅斑熱	日本	ツメムシ
	<i>R. felishii</i>	リボソール熱	北・中・東欧	ツメムシ
	<i>R. sibirica</i>	リボソール熱	ロシア連邦、アフガニスタン	ツメムシ
	<i>R. helvetica</i>	リボソール熱	東欧、アフガニスタン、ロシア	ヒメジリ科ノコシ
	<i>R. africae</i> , <i>R. helvetica</i> , <i>R. sibirica</i> , <i>R. typhi</i>	<i>Rickettsia sibirica</i> ダニ科	世界各地	ツメムシ
	<i>Q fever</i> <i>Bartonella</i>	ツメムシ科	日本(北海道)及びアフガニスタン	ツメムシ
	<i>Q fever</i> <i>Coxiella burnetii</i>	エリキア科	北米、東欧、南米、アフガニスタン	ツメムシ
	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> , <i>Anaplasma marginis</i>	エリキア科	北米、東欧、南米、ロシア	ツメムシ
	<i>Neorickettsia sibirica</i>	ダニ科	東日本	ヒメジリ
	<i>Bartonella quintana</i>	ダニ科	世界各地	ノコシ
	<i>B. henselae</i>	ダニ科	北・中・東欧	ノコシ
	<i>Coccidioides immitis</i>	担子菌	南米、東欧	ヒメジリ

●● 分子生物学的手法による、患者の病原体が明らかになっている。
 ●●● 宿主動物や媒介動物、媒介生物が明らかになっている。

本研究の目的

- 疫学的研究、サーベイランス体制の見直し、改善と、患者、病原体、ダニ、媒介動物についての総合的な調査を行う。
- 検査・診断研究、分子生物学的診断法の普及、検査技術、免疫学的手法を用いた新規の迅速実験室診断法の開発を試みる。現時点の関連機関での普及状況の実態調査を行い、診断用抗原、血清、リケッチア遺伝子等のレファレンス化の基盤整備を行う。
- 予防・治療研究、患者病態を解析し、詳細な免疫・病理学的な検討を行い重症化予防と治療法に結びつける。

本研究の流れ図



四国でのつつが虫病、日本紅斑熱サーベイランスの認知度(2008年11月)

つつが虫病	発生数		認知度(%)	
	(2000-2007)	全数把握であること を知っている		
徳島県	12	169/251	67.3	
香川県	1	135/236	57.2	
愛媛県	3	167/269	62.1	
高知県	40	136/212	64.2	
計	56	607/955	62.7	
日本紅斑熱	発生数		認知度(%)	
	(2000-2007)	全数把握であること を知っている		
徳島県	24	160/263	63.9	
香川県	0	108/236	45.8	
愛媛県	24	136/274	49.6	
高知県	65	121/218	55.5	
計	113	533/991	53.8	

疫学的研究 リケッチア感染症の国内サーベイランスの評価と改善

対象	熊本県 皮膚科医	熊本県 皮膚科医	宮崎県 皮膚科医	宮崎県 内科医兼 機関
回答率	69名 66%	73名 60%	27名 53%	232施設 41%
調査時期	2001年 1月	2006年 8月	2006年 12月	2007年 6月
感染症法に基づき感染症サーベイランスが行われているのを知っている割合が全数把握疾患であることを知っていた	28%	70%	56%	
つつが虫病が全数把握疾患であることを知っていた	26%	74%	70%	75%
日本紅斑熱が全数把握疾患であることを知っていた		51%	48%	41%

疫学的手法の重要性

疫学的研究 マダニからの分離調査集計(2006～2008年度)藤田ら

リケッチアの種別	マダニの種類	分離施設名
<i>Borrelia japonica</i>	ヤマトマダニ <i>Ixodes ricinus</i>	広島県徳島市 徳島県宇治島市 京都府白河町
<i>Borrelia burgdorferi</i>	セイウチマダニ シロフタマダニ ハンソウマダニ	香川県高松市 山形県東山町 香川県高松市 徳島県新島 徳島県新島 徳島県新島 北海道 札幌市 札幌市 北海道 札幌市 札幌市
<i>Borrelia sensu lato</i>	ヤマトマダニ	香川県高松市 徳島県高松市 徳島県高松市 徳島県高松市 徳島県高松市 徳島県高松市
<i>Borrelia sensu lato</i>	チロソギキリマダニ オオノソギマダニ オオノソギマダニ	徳島県高松市 徳島県高松市 徳島県高松市 徳島県高松市 徳島県高松市 徳島県高松市
マダニ種から確認されたリケッチアは、紅斑熱群9種、チフス群1種、所属不明1種・ヒト病原種としては、 <i>B. japonica</i> , <i>B. helvetica</i> , <i>B. Ichikangjengensis</i> , <i>B. canadensis</i> .		
・山林や山間部の農耕地だけがマダニの生息地ではない(都市部もあり)		
<i>Borrelia sensu lato</i>	オオノソギマダニ	香川県高松市 徳島県高松市
<i>Borrelia sensu lato</i>	シロフタマダニ	香川県高松市 徳島県高松市



ヒトアナプラズマ症の本邦初症例

- 1) 過去(2002~2003年)に高知県で日本紅斑熱が疑われた患者18名の保存血液・血漿を解析。2名の患者の血液からヒトアナプラズマに特異的な遺伝子が検出され、わが国での初めての初め本症が確認された。
- 2) いずれの患者も、発疹・発熱等のリケッチア感染症様の症状を示したが、入院によるミノサイクリンの治療により完治。
- 3) リケッチア感染症が疑われ、日本紅斑熱や、つつが虫病の検査が陰性の場合、ヒトアナプラズマ感染が存在する可能性がある。

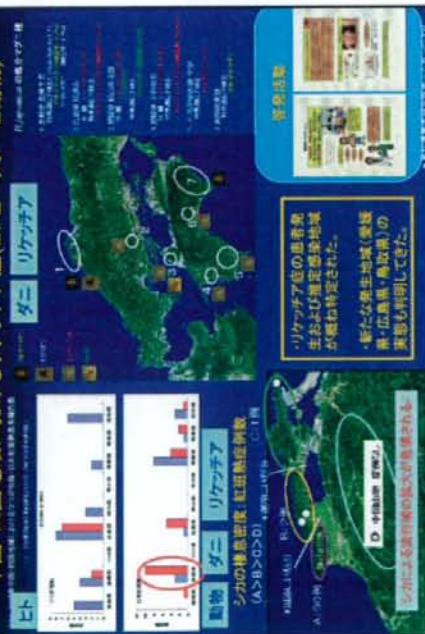
(高知県衛生研究所、静岡県立大学、国立感染症研究所の調査による
1)に「年感染症患者数表」にて発表予定)

インドネシア・バリ島からの帰国者2例が発疹熱を発生

平成20年1月20日~3月11日
サーフィン等のため滞在
3月19日帰国(9日目に悪寒、戦慄と共に発熱、
血漿3月25日に発疹が全身に出現。感染源に
血液残体および皮膚屑検体を提出。PCRにて
Rickettsia sibirica 遺伝子検出、抗体価の有意
上昇にて発疹熱と診断。

発熱 発疹 入国 帰国

疫学的研究 中国・四国地域におけるリケッチア症(ヒトとベクターと動物)



九州地域の日本紅斑熱の患者とベクターに関する調査





リケッチアのベクターとその保有病原菌型の多様性に関する実態調査

比較

■ 国内から東アフリカに分布する感染源 潜伏期長
・ タイロシ菌 (見取整理)
・ 黒田 (五十嵐ら)
・ 黒田 (五十嵐ら)

■ 感染源の現地調査 (国内調査)

■ 不特定地域 (多様な知見集積)
・ 新たな可能性 (北海道産半島)
・ 北東日本での *R. japonica* 検出
・ 南西諸島におけるベクター分布相

■ 特定地域 (定局調査の意味)
・ 欧州共通 *R. helvetica* 感染モデル (福井県: 糸島村確認地)
・ 高山帯のモデル (長野県白馬湖地)
・ 多発地の九州半島
・ 紅斑熱の新参産地 (三重県志摩半島)
・ 病種の住み分け (和歌山県紀伊地方)

リスクマップ (GIS画像) の試作

■ 重要種タテツツガムシ分布と症例発生地の相関につきGIS解析の準備
■ マップ作成に適した地域として「淡路島」を選定する準備と打合せ

↓ 以下に関係のデータを抽出し既存の資料に加えて利用 ↓

↓ 画像資料を衛生担当や国民へ提供 ↓

参考



獣医学領域からリケッチア感染症のサーベイランス (18~20年度)

リケッチアの多様性と家畜・野生動物の関与

① 家畜への感染

Rickettsia japonica
Rickettsia tamurae
Rickettsia asiatica
Rickettsia helvetica
Rickettsia tarasevichiae
Anaplasma phagocytophilum

② 中・大型哺乳類の疫学的役割

A. bovis
Ehrlichia shermanensis
Neoehrlichia mikurensis

家畜(牛)のリケッチア感染状況

沖縄県与那国島の牛(貧血症牛の同居牛調査)

(1) *Anaplasma phagocytophilum* PCR 12/15 (80.0%)

(2) *Anaplasma bovis* PCR 8/15 (53.3%)



マダニは全て
フタトゲチマダニ
(Ooshiro et al., 2008)

リケッチアの動物に対する病原性の検討

とくに家畜への病原性



① 日本紅斑熱リケッチア

犬への感染実験

流行地における犬の調査

結果: 0/1326頭 (全頭陰性)

⇒ 犬への病原性弱い



② 新規アナプラズマ

陽性牛の調査

⇒ 家畜に対する病原性不明

検査・診断研究

① 地帯研におけるリケッチア検査体制の現状調査(アンケート)

関東以北地域で検査可能なところ⇒つつが虫病 67%、日本紅斑熱 33%、
東海・北陸地域でのつつが虫病、日本紅斑熱ともに十分な検査体制は 1/8 のみ

② 現行の診断技術の検証、問題点の洗い出しと改良

• *O. Kyusuganumachi* DNA 検出法の改良
• 畜産からの検出と、型別も可能

• PCRの感度上昇
• 畜産の有用性検証

③ つつが虫病PCR陽性コントロール作成

1) *O. Kyusuganumachi* (GenBank: FJ414141)

2) *O. Kyusuganumachi* (GenBank: FJ414141)

3) *O. Kyusuganumachi* (GenBank: FJ414141)

4) *O. Kyusuganumachi* (GenBank: FJ414141)

5) *O. Kyusuganumachi* (GenBank: FJ414141)

6) *O. Kyusuganumachi* (GenBank: FJ414141)

7) *O. Kyusuganumachi* (GenBank: FJ414141)

8) *O. Kyusuganumachi* (GenBank: FJ414141)

④ 新規診断ツールの開発

標準化可能なリケッチア検査ツール(遺伝子・抗体)の開発

病理学的な検査法の検討



検査・診断研究

Rickettsia japonica 検出系の開発

- ゲノム情報を用いて *R. japonica* 特異的ORFを同定した。
- TaqMAN MGB probeを使用した *R. japonica* Real-time PCR 検出系を開発。高感度で、高い特異性を示した。
- Conventional PCRでは検出できなかった臨床サンプルからも50%の検出率で、*R. japonica* DNAの存在を確認できた。

• 以上より、実際の臨床応用が期待できる。